

8 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Nachteile von Platin(II)-Verbindungen wie ungenügende Löslichkeit, geringe Tumorzellselektivität und Resistenzentwicklung zu reduzieren und neuartige Substanzen mit hoher Antitumoraktivität zu entwickeln.

Ein bekannter Vertreter, der bereits Eingang in die Klinik gefunden hat, ist das Carboplatin. Es steht in fertigen Infusionslösungen in einer Konzentration von 10 mg/ml zur Verfügung. Untersuchungen an der HPLC ergaben das Auftreten eines unbekanntes Nebenproduktes, im Folgenden NP abgekürzt. Im Chromatogramm eluiert es mit einer Retentionszeit von 3.74 min bei Verwendung eines Na₂SO₄-Puffers deutlich früher als Carboplatin und muss somit hydrophilere Eigenschaften besitzen. Je nach Lagerzeit variiert der Gehalt von NP zwischen 0.44 und 4.8%. Mit Hilfe von HPLC und MPLC sollte dieses Abbauprodukt isoliert werden. Eine analytische Charakterisierung ergab das Vorhandensein von OH- und C=O-Gruppen sowie eine Massenzahl von 144 g/mol. Durch Abbauprozesse könnte ein Isomeres des Carboplatins, die 2-Oxo-tetrahydropyran-3-carbonsäure, entstehen. Deren Syntheseprodukt, Syn-NP, ließ im HPLC-Chromatogramm ein Gleichgewicht von Säure und Salz erkennen, wie es auch beim Fertigarzneimittel zu finden war.

Die folgende Verwendung eines KH₂PO₄-Puffers ergab überraschenderweise keine Übereinstimmung der Retentionszeiten von FAM und Syn-NP mehr. Weitere HPLC-Messungen ließen jedoch keine eindeutige Charakterisierung von NP zu, so dass fortführende Untersuchungen zur Strukturaufklärung von großer Wichtigkeit wären.

Des Weiteren sollte ausgehend vom Aqua[meso-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]-sulfatoplatin(II) durch Einführung verschiedener Dicarbonsäuren als Abgangsgruppen und dadurch möglicher Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Löslichkeit gesteigert werden. Für diese Untersuchungen wurden Malonsäurederivate zur Kopplung ausgewählt und die erhaltenen Verbindungen *in vitro* an den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 auf antiproliferative Wirksamkeit getestet.

Es zeigte sich eine Steigerung der Zytotoxizität durch Austausch der hydrophilen OH-Gruppe des **m-4F-OH-Mal**-Komplexes durch lipophilere Reste. Hierfür kamen Ester-, Ether- und Amidfunktionen zum Einsatz. Den stärksten Einfluss auf das Zellwachstum besaß **m-4F-AM-Mal**, gefolgt von **m-4F-Mal-Ester** und **m-4F-MeO-Mal**. Somit war ein Zusammenhang

einer Steigerung der Wirksamkeit mit zunehmender Destabilisierung des O-R-Restes zu beobachten.

Im Folgenden sollte nun gezeigt werden, ob durch Austausch eines der zwei identischen Arylreste des **4F-PtCl₂** durch verschiedene Alkylgruppen eine Steigerung der Antitumoraktivität zu erreichen ist. Die Verbindungen lagen enantiomerenrein vor, so dass ebenfalls die Konfiguration des Ethylendiaminliganden für einen Effekt von Interesse war. An den verwendeten Mamma- und Prostatakarzinomzellen waren sehr gute antiproliferative Eigenschaften der [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe zu erzielen. Es ließ sich in allen Fällen die zytotoxische Wirkung von Cisplatin übertreffen.

Deutliche isomere Unterschiede traten besonders an LNCaP/FGC-Zellen auf. **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** waren zum Teil bereits zytozid (**SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** bei 5 μM mit $T/C_{\text{corr}} = -24\%$ an LNCaP/FGC).

Ausgehend vom Austausch einer C2-Methyl- durch eine Ethylgruppe war schließlich mit Einführung eines Isopropylrestes die stärkste Antitumoraktivität zu erreichen. Ein tertiärer Butylsubstituent brachte eine Wirkminderung mit sich, was eventuell auf sterische Effekte zurückzuführen sein könnte.

An MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen ließ sich ein stärkerer Einfluss der RR-konfigurierten Komplexe beobachten. An den LNCaP/FGC-Linien war kein Vorteil einer Enantiomeren-trennung der RR/SS-konfigurierten Komplexe zu verzeichnen.

Eine Variation des Arylrings am C1 des Neutralliganden mit verschiedenen Substituenten brachte für Verbindungen mit einem tertiären Butylrest am C2 keine Wirksteigerung an MCF-7 und MDA-MB-231-Zellen. Dort blieb das **4F-Ph/tBut-Cl₂** die reaktivste Komponente. An LNCaP/FGC-Zellen war dies **Ph/tBut-Cl₂** mit einem unsubstituierten Phenylring. Ebenso wurde hier eine gesteigerte antiproliferative Wirksamkeit von **OH-Ph/tBut-Cl₂** und **MeO-Ph/tBut-Cl₂** beobachtet.

Die Zytotoxizität einer Substanz ist abhängig von ihrer Reaktivität und Stabilität. Daher wurde ein geeignetes HPLC-Modell zur möglichen Abschätzung der DNA-Bindung sowie von Inaktivierungsreaktionen durch körpereigene Proteine eingesetzt. Als Modellnukleophil diente Iodid. An den Testungen mit Verbindungen mit chelatgebundener Dicarbonsäure als Abgangsgruppe zeigte sich eine Übereinstimmung mit den *in vitro*-Untersuchungen. **M-4F-OH-Mal** besitzt eine reaktionsträge Abgangsgruppe, was mit geringer DNA-Bindung aber auch weniger Inaktivierung durch Bionukleophile einhergeht. Für **m-4F-Mal-Ester** und **m-**

4F-MeO-Mal ließ sich die Reaktivität gut mit der ermittelten Antitumoraktivität vergleichen. Der Esterrest von **m-4F-Mal-Ester** wies allerdings optimalere Werte als **m-4F-MeO-Mal** in Bezug auf Solvens- und Nukleophilweg auf, was für eine bessere Pharmakokinetik sprechen könnte.

Die asymmetrischen Komplexe **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** zeigten sich wie bei der *in vitro*-Testung an den LNCaP/FGC-Prostatakarzinomzellen reaktiver als ihre jeweiligen Isomere. Viel versprechende Ergebnisse waren für **RS-** und **SR-Ph/Met-Cl₂** zu erhalten. Die Bindung an Nukleinsäuren wäre aufgrund der erhaltenen Daten ausreichend hoch, die an Proteine gering.

Die Untersuchung einer möglichen pH-abhängigen Aktivierung von **4F-Ph/Et-Cl₂** und **4F-Ph/iProp-Cl₂** führte zu keinen Unterschieden im Hinblick auf die Reaktivität. Für die Komplexe mit chelatgebundenen Dicarbonsäuren zeigte sich ein H⁺- und OH⁻-katalysierter reaktionskinetischer Verlauf. Dies wurde besonders bei **m-4F-OH-Mal** und **m-4F-Mal-Ester** deutlich.

In neueren Studien zur Antitumoraktivität kommen verstärkt polynukleare Substanzen zum Einsatz, deren pharmakologische Eigenschaften noch nicht ausreichend untersucht worden sind. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Alkylamine mit [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Verbindungen gekoppelt. Der Einfluss der entstandenen Komponenten wurde im Hinblick auf Zellaufnahme, DNA-Bindung, Interaktion mit Proteinen und Zytotoxizität untersucht. Hierbei standen der Einfluss der variierenden Alkylkette des Brückenliganden sowie die aus der unterschiedlichen Abgangsgruppe resultierende Ladung im Vordergrund.

Die Zellaufnahme erhöhte sich mit steigender positiver Ladung und zunehmender Länge der lipophilen Kette. Ebenso war der Platingehalt in Zellkern und DNA von diesen Parametern abhängig und zeigte vergleichbare Ergebnisse wie die Zellaufnahme. Leider wurde hierdurch auch die ohnehin kritische Proteinbindung erhöht. **M-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** besaß als tetranuklearer Komplex die stärksten Wechselwirkungen. Daher waren die *in vitro*-Effekte an MCF-7-Zellen in FCS-haltigem Medium geringer als in freiem. Immerhin wiesen **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** und **m-4F-Pt-DAN-Cl** eine 50%ige Hemmung an MCF-7-Zellen auf. Untersuchungen an humanen NHL- und CML-Zelllinien im Vergleich zu Cisplatin belegte Inaktivität der Alkylaminplatin(II)-Komplexe für CML-Zellen. An NHL-Linien wirkte besonders **m-4F-Pt-DAN-Cl** hemmend auf das Zellwachstum. Bei der Bestimmung des IC₅₀-

Wertes an MCF-7- und Fibroblastenzellen erwies sich ebenfalls **m-4F-Pt-DAN-Cl** als am reaktivsten.

Dendrimere als Trägermoleküle für Zytostatika sind eine weitere Möglichkeit zur Herstellung neuer Tumortheraeutika. Die Anbindung von Platin(II)-Komplexen an diese Makromoleküle soll die Selektivität für Tumorzellen gegenüber gesundem Gewebe erhöhen.

Daher wurden Dendrimere sowohl mit Ethylendiamin-Funktionalitäten als auch terminalen Dicarbonsäuren zur Kopplung mit Platin(II)-Wirkstoffen eingesetzt. Die Zellaufnahme geschah in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation. Einen hohen zellulären Gehalt besaßen vor allem **G₀(DAP-PtHal₂)₂(DAP)**. PEG-Gruppen verschlechterten die Zellanreicherung ebenso wie die Einführung von Dansylgruppen als Fluoreszenzmarker. Der Kerngehalt der untersuchten Dendrimere überstieg die Akkumulation von Cisplatin. Aber auch die Interaktion mit humanem Serumalbumin war sehr hoch, so dass zur Ausübung antiproliferativer Effekte nur ein geringer Teil zur Verfügung stand. Dendrimersplatin(II)-Verbindungen mit Chlorid als Abgangsgruppe waren hierbei aktiver als solche mit Iodid. Bei Kopplung von **m-4F-PtSO₄**-Komplex an die Malonsäureterminierten Makromoleküle war bei einer Konzentration von 5 µM Cisplatin-ähnliche Wirkung nachweisbar.

An Fibroblasten und Keratinozyten ließ sich mittels MTT-Test keine selektive Wirkung für Tumorzellen beobachten. Bereits die Dendrimergundkörper ohne Platinbelegung SF-G₂ und D-25 hatten einen sehr starken Einfluss auf die Viabilität humaner Gewebeskulturen.

Abgeleitet aus diesen Ergebnissen könnte es demnach möglich sein, durch Wahl geeigneter Neutralliganden die Bereiche maximaler Reaktivität zu steuern. Eine pH-abhängige Aktivierung im sauren Milieu der Tumorzellen wäre wünschenswert. Durch Anbindung an Makromoleküle könnte eine spezifische Spaltung von Ausgangsdendrimer und Zytostatikum durch säurelabile Spacer bevorzugt im Tumorgewebe stattfinden.

Ferner wäre es wichtig, die Zellaufnahme sowie die DNA-Bindung der hochwirksamen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Verbindungen näher zu charakterisieren.

8a Zusammenfassung Englisch

Goal of this work was to reduce the disadvantages of Platinum(II)-compounds like insufficient solubility, less cancer cell selectivity and emergence of resistances as well as to develop novel substances offering high anti-cancer activity.

A known substance which is already used in medical course of work is Carboplatin. It's available as ready to use infusion solutions in a concentration of 10 mg/ml. Investigations on HPLC exhibited the occurrence of an unknown side product which is below named as NP. Using Na₂SO₄-buffer from the chromatogram a retention time of 3.74min could be derived for that species which is much faster than for Carboplatin. A more hydrophilic behaviour was therefore assumed for NP. Depending on the time Carboplatin was stored the content of NP is varying between 0.44% und 4.8%. Plan was to isolate this degradation product using HPLC and MPLC. Analytical characterisations displayed the occurrence of OH- und C=O-groups and a mass number of 144 g/mol. From theoretical point of view an isomere of Carboplatin, 2-Oxo-tetrahydropyran-3-carbonic acid, could have been emerged by degradation processes. Their synthesis product, named Syn-NP, were examined and found to show a balance of acid and salt as known from the ready to use drug. The following analysis using KH₂PO₄-buffers showed surprisingly no accordance of the retention times of both products. Further HPLC approaches failed for explicit characterisation of NP, therefore the analysis of the structure itself became most important.

Further goal was the enhancement of solubility of Aqua[meso-1,2-Bis(4-fluorophenyl)-ethylenediamine]sulfatoplatinum(II) by introduction of several dicarbonic acids leading to the formation of hydrogen bonds. Derivatives of malonic acid were used for coupling and the obtained components were tested for antiproliferative activity on mammalian cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. An increase of cytotoxicity was obtained by exchange of the hydrophobic OH-group of the **m-4F-OH-Mal**-complex by even more lipophilic groups. Used examples were Ester-, Ether- und Amid-functions. The strongest influence on cell growth proved **m-4F-AM-Mal**, followed by **m-4F-Mal-Ester** and **m-4F-MeO-Mal**. This can be interpreted as an increase of cytotoxic activity with increasing destabilisation of the O-R-group.

Question was further to prove if an exchange of one of the both identical aromatic rings of **4F-PtCl₂** by several alkylgroups increases the anti-cancer activity. The substances were enantiomerically pure, therefore, looking for the anti-cancer activity, the configuration of the ethylenediamine ligands were also of interest. Very good antiproliferative activity of [1-Aryl-2-alkylethylenediamine]platinum(II) compounds was proved on mammalian and prostate cancer cells. In any tested case the cytotoxic activity exceeded that of Cisplatin.

Clear isomeric differences were seen at LNCaP/FGC-cells. **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** and **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** were already partly cytotoxic (**SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** with 5 μM and T/C_{corr} = 24% at LNCaP/FGC).

Starting with the exchange of a C2-methyl by an ethyl group finally the strongest antitumor activity was found by introduction of an isopropyl group. The use of a tertiary butyl moiety weakened the activity what was believed a sterical effect.

At MCF-7- and MDA-MB-231-cells a stronger influence of RR-configured complexes was found. At LNCaP/FGC-lines no advantage of enantiomeric separation of the RR/SS-configured complexes were obtained. A variation of the C1-aryl ring of the neutral ligand done with different substituents was without positive effect on MCF-7 and MDA-MB-231-cells with a tertiary butyl group. At these cells still **4F-Ph/tBut-Cl₂** proved to be the most reactive component. At LNCaP/FGC-cells **Ph/tBut-Cl₂** with a non-substituted phenyl ring took that role. Further, an antiproliferative action of **OH-Ph/tBut-Cl₂** and **MeO-Ph/tBut-Cl₂** was observed.

The cytotoxic activity of a substance depends on their reactivity as well as stability. Therefore an appropriate HPLC model was developed for estimating DNA binding and inactivation factors due to human proteins. Iodide was used as a model nucleophilic agent. The tests using chelate-bounded dicarboxylic acid as leaving group exhibited correspondent results to in-vitro examinations. For **M-4F-OH-Mal** was found that the relatively inactive leaving group is responsible for weak DNA binding but also for less inactivation due to nucleophilics. For **-4F-Mal-Ester** and **m-4F-MeO-Mal** the reactivity corresponded well with the anticancer activity. Interestingly the leaving group of **m-4F-Mal-Ester** showed better results than **m-4F-MeO-Mal** concerning solvent and nucleophilic features. That would hint to better pharmacokinetics of **m-4F-Mal-Ester**.

The asymmetric complexes of **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** and **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** proved to have a better reactivity on LNCaP/FGC prostate cancer cells than the corresponding isomers. The same picture was obtained in the in vitro tests. Promising results were collected for **RS-** and

SR-Ph/Met-Cl₂ components. From our data could be derived that the binding to nucleophilic acids is strong whereas protein binding is weak.

Examination of a possible pH-dependent activation of **4F-Ph/Et-Cl₂** und **4F-Ph/iProp-Cl₂** showed no differences concerning reactivity. Complexes with chelatbounded dicarbonic acids exhibited an H⁺ and OH⁻ catalysed reaction kinetics. Most obvious was this behaviour at **m-4F-OH-Mal** und **m-4F-Mal-esters**.

Actual studies often report about anticancer activity of polynuclear substances whose pharmacological properties are hardly analysed yet. For that reason we coupled during the herewith presented work different alkyl-amines with [1,2-Bis(4-fluorophenyl)-ethylenediamine]platinum(II)-compounds. The properties of the resulting complexes were analysed in terms of cell absorption, DNA-binding, interaction with proteins and cytotoxicity. In this connection the influence of varying alkyl chains of the bridging ligands as well as the charge resulting from different leaving groups were of main interest.

The cellular uptake elevated with increasing positive charge and growing length of the lipophilic chain. Further, the platinum content of cell nucleus and DNA showed a dependency on these parameters and was therefore comparable to the cellular uptake results. Regretfully also a parallel increase of the critical protein binding was obtained. **M-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** as a tetranuclear compound showed the strongest interactions. Therefore the in vitro effects on MCF-7-cells in FCS containing medium were not as good as without FCS. After all **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** und **m-4F-Pt-DAN-Cl** proved a 50% inhibition of MCF-7-cells. Examinations of human NHL and CML cell lines demonstrated the inactivity of the Alkylamineplatinum(II)-complexes for CML-cells compared to Cisplatin. At NHL lines especially **m-4F-Pt-DAN-Cl** was inhibiting the cell growth. During determination of the IC₅₀-values on MCF-7 and fibroblasts also the **m-4F-Pt-DAN-Cl** was the most reactive species.

Dendrimeres as carriers for cytostatic drugs are a new possibility for the creation of novel chemotherapeutics. The coupling of platinum(II) complexes to these macromolecules should increase the selectivity for cancer cells compared to normal tissue.

Thus dendrimeres with ethylenediamine functionality as well as with terminal dicarbonic acid were used for coupling with platinum(II) compounds. The cellular uptake was dependent on the surface modification of the dendrimeres. Especially **G₀(DAP-PtHal₂)₂(DAP)** exhibited finally a high cellular content. On the other hand PEG groups decreased the accumulation in cell as well as the introduction of dansylic groups which were used as fluorescence markers.

With respect to nucleus accumulation in target cell the analysed dendrimeres exceeded the benchmark value of Cisplatin. On the other hand also the interaction with human serumalbumin was very high, thus leading to an only limited fraction available for anti-proliferative effects. Chloride used as leaving group in Dendrimere-platinum(II) compounds gave better activity than iodide in same position. Similar action to 5 μ M Cisplatin was obtained for the coupling of **m-4F-PtSO₄**-complexes at malonic acid determined macromolecules.

For fibroblasts and keratinocytes the MTT-test showed no selectivity for cancer cells. Even the pure dendrimeric bodies SF-G₂ and D-25 without platinum content exhibited a strong influence on human cell viability.

Learning from these results it should be possible to control regions of maximum reactivity by the choice of proper neutral ligands. Further, a pH-dependent activation within the acidic environment of the cancer cell would be best case. An intracellular split in cytostatic drug and base dendrimere would happen by the use of acid controlled spacers targeting most preferred cancer tissue.

Furthermore, a closer characterisation of cell uptake and DNA-binding of the very promising [1-Aryl-2-alkylethylenediamine]platinum(II)-compounds would be very important.